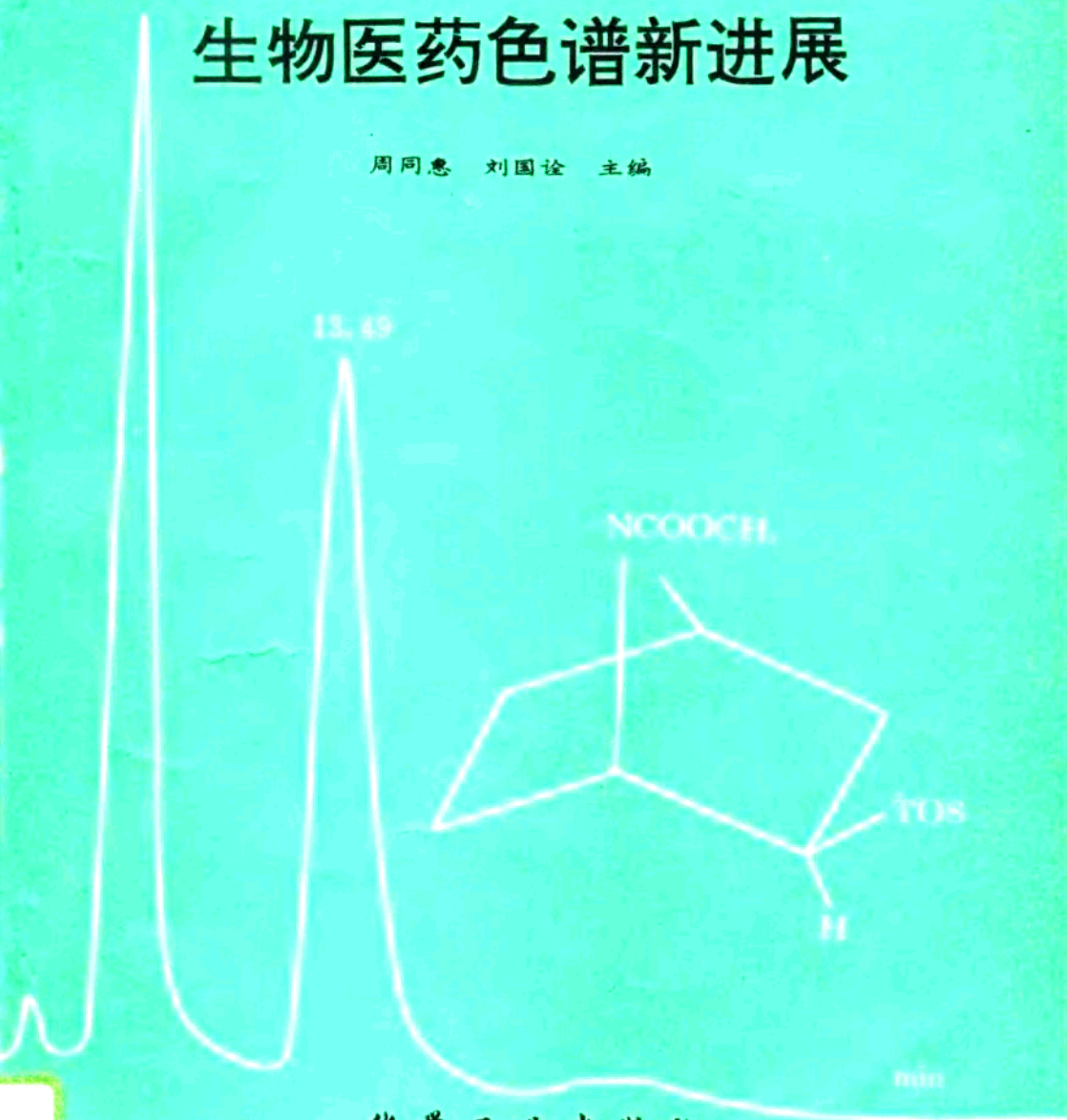


9.43

# 生物医药色谱新进展

周同惠 刘国詮 主编



化学工业出版社

## 序 言

中国化学会组织的全国生物医药色谱学术报告会自 1988 年首次召开以来,在色谱界广大同仁的共同努力和支持下,历经五届而不衰。这充分说明,作为一种强有力的分离、分析手段的色谱在生物医药领域中有着广泛的应用,它必将随着生命科学及生物医药科学技术的发展而保持旺盛的生命力。

第五届全国生物医药色谱学术报告会 1996 年 10 月 28~31 日在北京如期召开。

本届会议收录论文 122 篇,按综述、气相色谱、液相色谱、毛细管电泳、薄层色谱及其他五部分顺序编排成书,由化学工业出版社正式出版,是为《生物医药新进展》(第三卷)。我们高兴地看到,所收录论文的水平有了新的提高。当今国际上色谱学的许多热点和前沿课题在我们的会议上均有所反映与呼应,如对映体拆分、生物大分子的分离、新型柱材料、毛细管电泳以及液相色谱、毛细管电泳与质谱的联用技术等。此外,从作者的队伍可以看出,一批年轻的色谱工作者正崭露头角,活跃在生物医药色谱研究的领域中,此尤为可喜可贺之事。

本次会议由中国科学院化学研究所负责具体筹办。在筹备过程中,深得色谱界同仁的热情关怀和帮助,国内外一些知名的色谱仪器公司和厂家提供了赞助与支持,使我们的会议得以圆满成功。我谨代表本次会议筹备组向朋友们致以诚挚的谢意。

周同惠

一九九六年八月

# 《生物医药色谱新进展》(第三卷)

## 编辑委员会

主 编 周同惠 刘国詮

编 委 (按姓氏笔画排列)

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 马立人 | 于世林 | 卢佩章 | 孙亦梁 | 刘国詮 | 张玉奎 |
| 张任恩 | 张天佑 | 陆婉珍 | 汪正范 | 竺 安 | 周同惠 |
| 周良模 | 俞惟乐 | 耿信笃 | 夏其昌 | 凌大奎 | 黄骏雄 |
| 程介克 | 傅若农 |     |     |     |     |

## 致 谢

第五届全国生物医药色谱学术报告会承蒙下述单位赞助,谨致谢意:

美国热分离产品公司  
伯乐分析生化仪器有限公司  
发玛西亚生物技术(中国)有限公司  
珀金-埃尔默中国公司应用生物系统部

迪马公司  
潮声技术开发公司  
天津胜达过滤器件厂  
照生有限公司  
大连依利特仪器有限公司  
北京泰立化公司  
奥特赛恩斯(天津)有限公司  
天津基恩测试仪器有限公司

# 目 录

## 综述

|                                    |             |       |
|------------------------------------|-------------|-------|
| 液相色谱-质谱联用在医药方面的应用 .....            | 蒋 可         | ( 1 ) |
| 模色谱——生物医药制品纯化分离的有效工具 .....         |             |       |
| ..... 商振华 郭 为 于忆年 周良模              | ( 5 )       |       |
| 细胞膜受体色谱法——研究药物与受体作用的新方法 .....      | 贺浪冲 耿信笃     | ( 8 ) |
| 高速逆流色谱的新进展 .....                   | 张天佑         | (10)  |
| HPLC 在生物技术下游工程中的应用进展——连续分离色谱 ..... | 黄骏雄         | (13)  |
| 电荷转移型色谱固定相的合成及其在生物大分子分析中的应用 ...    | 黄朝阳 于世林     | (14)  |
| 连续自由流电泳 .....                      | 夏其昌         | (16)  |
| 疏水色谱的进展及其在生化研究中的应用 .....           | 刘 彤 耿信笃     | (20)  |
| 毛细管电泳光学及电化学检测及其在生物医学中应用研究 .....    | 程介克         | (22)  |
| 探讨建立药物高效液相色谱分析方法中的若干问题 .....       | 梁贵键 朱 莉     | (25)  |
| 毛细管电色谱研究进展 .....                   | 罗国安         | (29)  |
| 逆流色谱法及其在有机药物分析中应用的新进展 .....        | 赵守孝         | (31)  |
| 离子色谱在食品分析中的应用 .....                | 丁明玉 陈培榕 罗国安 | (33)  |

## 气相色谱

|                                      |                 |      |
|--------------------------------------|-----------------|------|
| 气相色谱法测定布洛芬胶囊含量 .....                 | 刘师莲 刘传华 纪金凤 韩照华 | (34) |
| GC 色谱法同时测定肝素钠粗品中残留甲醇、乙醇与丙酮的含量 .....  |                 |      |
| ..... 刘传华 刘师莲 郑玉兰 解希田 刘红英            | (36)            |      |
| 气相色谱法测定脑瘤病人脑脊液乳酸浓度 .....             | 李晓晔 许自超 孙晓莉 许 兵 | (38) |
| 鸟嘌呤碱基氧化损伤产物 8-羟基鸟嘌呤的 CGC/MS 检测 ..... |                 |      |
| ..... 宋元宗 庄海旗 祝其锋 莫丽儿                | (40)            |      |
| GC-AED 联用方法系统分离分析 12 种滥用药物 .....     | 顾明松 霍秀敏         | (42) |
| 肺癌组织脂肪成分分析 .....                     | 程冬娥 曾昭睿 郭建军 吴采樱 | (45) |
| 灭螺药 Na-PCP 中痕量二噁英毒物的分离和可靠定量 .....    |                 |      |
| ..... 蒋 可 陈宇东 李灵军                    | (46)            |      |
| 气相色谱测定血清中丙戊酸的改进方法 .....              | 陈桂茹 韩会欣 常凤启     | (47) |
| 气相色谱法测定一次性使用输液(血)器水浸液中环己酮浓度 .....    |                 |      |
| ..... 蒋文强 李关宾 吕 霞                    | (48)            |      |
| 气相色谱保留指数谱用于白芷鉴别的研究 .....             |                 |      |
| ..... 凌大奎 田立杰 田南卉 方 颖 张 伟            | (50)            |      |

## 液相色谱

|                                                 |         |      |
|-------------------------------------------------|---------|------|
| 多糖类硫酸酯在乙肝表面抗原(HBsAg)分离纯化中的应用 .....              | 李雨田     | (52) |
| 小麦幼苗中内源激素(GA <sub>3</sub> , IAA)的高效液相色谱测定 ..... | 唐根源 吴红京 | (53) |
| 微透析-高效液相色谱法测定药物与蛋白质的相互作用 .....                  |         |      |
| ..... 汪海林 邹汉法 冯埃生 张玉奎                           | (55)    |      |

|                                           |                                 |      |
|-------------------------------------------|---------------------------------|------|
| 疏水色谱中蛋白质的 Z 值与流动相中脲浓度的关系 .....            | 卫引茂 耿信笃                         | (56) |
| 胞嘧啶核苷酸-无定形多晶硅粒键合相的制备及在蛋白质分析中的应用 .....     | 于世林 苗凤琴 刘 咏                     | (57) |
| 用反相高效液相色谱法对重组人干扰素- $\gamma$ 的预浓集研究 .....  | 张 玲 张启东 张丽华 耿信笃 张智清 侯云德         | (59) |
| 以免疫球蛋白 IgG 为配体的免疫亲和介质的研究 .....            | 贾凌云 杨 利 郭玉凤 孔 亮 邹汉法 张玉奎         | (61) |
| HPLC 联结质谱、酶解和 Edman 降解方法快速测定痕量蛋白质结构 ..... | 蒋 可 陈宇东                         | (62) |
| 高效阳离子交换色谱法分离玉米扩张蛋白质的放大 .....              | 李连朝 王学臣 荆家海                     | (64) |
| Con A 为配基的高效制备亲和色谱分离人脑脊液中 IgG .....       | 徐学斌 吴晓军 韩慧婉 刘国詮 李虹蔚 冯方波         | (66) |
| 羟基磷灰石(HAP)柱分离腹水探讨 .....                   | 黄健英 牛瑞芳 杨乃中 赵秋雯 范国梁 闰 颖 万东林 刘迎五 | (67) |
| 亲和膜堆用于水溶液中内毒素的吸附 .....                    | 郭 为 商振华 于亿年 周良模 孙仲治 马立人         | (68) |
| 生物样品里 DNA 加合物的色谱分析 .....                  | 刘淑芬 蒋湘宁 徐晓白                     | (70) |
| 金属螯合亲和膜色谱介质的研制及其对牛肝过氧化氢酶分离纯化的研究 .....     | 杨 利 贾凌云 孔 亮 郭玉凤 邹汉法 张玉奎         | (72) |
| 以噬菌体展示技术寻求亲和色谱配基的探索 .....                 | 杨子义 沈倍奋 乔桂娟 刘国詮                 | (74) |
| 液相色谱二步法纯化人中性粒细胞防御素 .....                  | 刘文超 刘智广 张晓楠 陈家露 张学庸             | (75) |
| 生物体液内谷胱甘肽和半胱氨酸的高压液相色谱测定法 .....            | 程敬君 匡培根 张凤英 刘洁晓                 | (77) |
| 高效液相色谱法测定饲料用鱼粉中氨基酸含量 .....                | 李来生                             | (79) |
| 氨基酸对映体在生物大分子手性固定相上的拆分 .....               | 王彤文 岐 琳 贺浪冲                     | (81) |
| 两性化合物 $dl(\pm)$ 色氨酸等在人血清蛋白柱上色谱行为的研究 ..... | 傅 强 贺浪冲 常 春 杨广德 陈慧娟 吴美香         | (83) |
| 大白鼠力竭游泳运动后脑内微透析液中痕量氨基酸的变化 .....           | 韩慧婉 钟兴明 舒鸿钧 姚鸿恩 刘国詮             | (85) |
| 玉米蛋白水解物的高效液相色谱测定与研究 .....                 | 翟瑞文 陈子林 余世望 李雁群                 | (87) |
| 人参培养细胞中活性六糖的分离纯化 .....                    | 邓 斌 郑光植 沈月毛 罗建平 甘烦远             | (88) |
| 反相高效液相色谱法测定 $dl$ - 蔡普生和它的 5- 溴代物 .....    | 王义明 扶 晖 石鸿昌                     | (89) |
| 药物反相液相保留测试及其色谱行为规律 .....                  | 梁贵键 朱 莉 邹凤君 胡永礼                 | (90) |
| 体内药物 HPLC 分析样品预处理与内标选择:问题与对策 .....        | 梁贵键 朱 莉                         | (92) |
| 强镇痛活性天然产物 Epibatidine 合成中间体的对映体拆分 .....   | 李雷鸣 高连勋 张 欣 丁孟贤 许建平             | (94) |
| 高效液相色谱法测定头孢哌酮钠滴眼液的含量 .....                | 高秀华 董伟林                         | (96) |

|                                                     |                                       |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 高效液相色谱法测定西洋参蜂王浆中的 10-羟基-2-癸烯酸                       | 杨 枫 孙载民 孙 巍 张立坤 徐荣芳 余 晓 张蔚青 邹安庆 ( 97) |
| 高效液相色谱法测定人牙龈沟液中的吡啶美辛                                | 余 晓 张蔚青 张立坤 耿素芳 邹安庆 ( 99)             |
| 超临界萃取豆油脱臭馏出物中生育酚的高效液相色谱分析方法研究                       | 周心如 于恩平 张 焱 (100)                     |
| $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -环糊精的高效液相色谱分析         | 王文芝 韩振泰 (102)                         |
| 反相 HPLC 分析阿霉素的血药浓度                                  | 梁 统 郑艳芬 丁 航 周克元 凌光鑫 (104)             |
| 高效液相色谱/电喷雾质谱(HPLC/ESIMS)联用技术在农药残留监测中的应用             | 金 军 赵国栋 蒋 可 (105)                     |
| HPLC 紫外检测法测定血和尿中草酸                                  | 张惠静 张世德 任建敏 (106)                     |
| 用 NS/RE 色谱法测定川芎中的阿魏酸                                | 歧 琳 贺浪冲 (108)                         |
| <i>o</i> , <i>m</i> , <i>p</i> -氯-二苯甲烷高效液相色谱快速分析法研究 | 刘红霞 张西林 张书胜 袁倬斌 (110)                 |
| 反相高效液相色谱-荧光检测法测定血清中茶呋胺含量                            | 余 琛 张 慧 洪有采 崔桂仙 夏粉英 (111)             |
| 血清和尿中假尿苷的高效液相色谱法测定                                  | 江 丽 梁 统 凌光鑫 莫丽儿 (113)                 |
| 手性试剂柱前衍生化 HPLC 法测定血浆中普罗帕酮和地丙苯酮的对映体                  | 钟大放 王亚芹 陈仁弟 王爱民 (114)                 |
| 使用 CHIRAL-AGP 高效液相色谱柱分离 3 种手性新药的对映体                 | 钟大放 王亚芹 顾景凯 (116)                     |
| 硫酸普拉酮钠 HPLC 分离测定方法的研究                               | 周立春 施 捷 (118)                         |
| 淫羊藿及其制剂中的淫羊藿甙的 HPLC 分析                              | 梁 统 丁 航 周克元 凌光鑫 (120)                 |
| 高效液相色谱法测定天麻复方胶囊中红景天甙的含量                             | 胡凤祖 邵 云 赵静玫 (121)                     |
| 高效液相色谱法测定碘离子                                        | 潘 峰 孙 玮 熊鸿燕 (122)                     |
| 高效液相色谱法跟踪检测 5-溴-6-甲氧基-2-乙酰苯的脱溴反应                    | 扶 晖 王义明 石鸿昌 (124)                     |
| 反相高效液相色谱法测定壮骨丸中补骨脂素的含量                              | 吴玫涵 刘玉波 李 征 陈 鹏 冯瑞灏 (125)             |
| 应用反相高效液相色谱法测定食品中泛酸及其钙盐                              | 陈青俊 任一平 黄百芬 (127)                     |
| 高分子类型 HPLC 填料的研究——一种颗粒均匀大孔结构的基质树脂                   | 金 超 苏天升 (130)                         |
| 交联聚苯乙烯树脂用作高效反相色谱填料的研究                               | 杨树明 田秀兰 苏天升 (131)                     |
| 亲水型高聚物涂敷硅胶作基质的 CM 型高效阳离子交换色谱填料的研制                   | 吴晓军 杨 睦 刘国詮 (132)                     |
| 高效弱阴离子交换色谱填料的研制及生物工程产品的分离纯化                         | 何秀娟 吴晓军 林启山 刘国詮 (133)                 |
| 具有亲水表面的新型高效反相色谱固定相的研究                               |                                       |

|                                        |       |
|----------------------------------------|-------|
| ..... 乔桂娟 王天用 林启山 吴晓军 刘国詮              | (135) |
| 以硅胶为基质的新型高效疏水作用色谱固定相性能研究               |       |
| ..... 乔桂娟 王天用 何秀娟 林启山 吴晓军 刘国詮          | (137) |
| 高效疏水作用色谱填料的研制、扩试及生物工程产品的分离纯化           |       |
| ..... 何秀娟 赵睿 吴晓军 乔桂娟 王萍 刘国詮            | (140) |
| 硅藻土层析柱净化效果的探讨..... 于国胜 于维森             | (141) |
| 毛细管电泳                                  |       |
| 中药菟丝子所含植物蛋白的高效毛细管电泳研究                  |       |
| ..... 胡平 罗国安 王如骥 郭洪祝 李家实               | (143) |
| 肾功能不全时尿液 HPCE 图谱..... 史京衡 韩玉麒 吴增常 滕小洪  | (145) |
| 非胰岛素依赖型糖尿病患者尿液中检出 S 物质                 |       |
| ..... 史京衡 韩玉麒 滕小洪 周克瑜 吴增常              | (146) |
| 尿激酶的尿液 CE 监测..... 史京衡 符伟国 滕小洪 吴增常      | (147) |
| 毛细管电泳法检测人尿液中的纤维蛋白肽 A、肽 B               |       |
| ..... 程明刚 梁统 周克元 凌光鑫                   | (149) |
| 合成罂粟花粉肽的毛细管电泳分离                        |       |
| ..... 生春莅 周欣 许家喜 金声 靳慧 李方 顾峻岭 傅若农      | (150) |
| 异硫氰荧光素衍生用于大鼠脑微透析液中氨基酸的高效毛细管电泳-激光诱导荧光测定 |       |
| ..... 盛力 马明生 韩慧婉 吴晓军 刘国詮               | (152) |
| 糖尿病患者尿液 HPCE 图谱                        |       |
| ..... 史京衡 吴增常 滕小洪 顾耀 李文君 韩玉麒 伍贻新       | (153) |
| 痕量单糖苯甲酰肼衍生物的高效毛细管电泳分析..... 林启山 刘国詮     | (154) |
| 荧光素异硫氰酸酯——肼的合成及其用于痕量糖的 HPCE 分析         |       |
| ..... 林启山 章文春 刘国詮                      | (156) |
| 高效毛细管电泳分离单唾液酸神经节苷脂..... 余兆楼 常理文 徐桂云 陈义 | (157) |
| 毛细管区带电泳法测定复方洗必泰栓中甲硝唑和醋酸洗必泰             |       |
| ..... 郭伟英 赵燕 王蕾                        | (158) |
| 毛细管电泳/质谱联用技术对尿中肌酐的定性、定量测定              |       |
| ..... 周克瑜 史京衡 韩玉麒 滕小洪 曹亚澄 吴增常          | (159) |
| 毛细管电泳分析前列腺素..... 何金兰 李惠萍               | (161) |
| 复方抗感冒药——康得、康泰克的毛细管电泳定量分析               |       |
| ..... 孙碧云 孙亦梁 孙曾培                      | (162) |
| 4 种复方降压药的毛细管电泳定量分析..... 孙碧云 孙亦梁 孙曾培    | (163) |
| 应用环糊精-毛细管区带电泳体系对 27 种碱性药物的手性分离研究       |       |
| ..... 王志 黄爱今 孙亦梁 孙曾培                   | (165) |
| 5 种嘧啶或喋啶类衍生物的毛细管电泳法检测                  |       |
| ..... 程明刚 梁统 周克元 凌光鑫                   | (166) |
| 毛细管电泳法测定人血清中草酸浓度..... 丁航 梁统 周克元 凌光鑫    | (167) |
| 毛细管电泳对取代咪唑类手性化合物的定量分析                  |       |
| ..... 周欣 顾峻岭 傅若农 张黎 金声                 | (168) |
| 溶剂对 2,6-二羟甲基- $\beta$ -CD 手性分离的影响      |       |

|                                         |       |
|-----------------------------------------|-------|
| ..... 靳 慧 李 方 顾峻岭 傅若农 刘 玉 戴荣继           | (170) |
| 2,6-二羧甲基- $\beta$ -CD 用于毛细管电泳中手性分离的研究   |       |
| ..... 靳 慧 李 方 顾峻岭 傅若农 刘 玉 戴荣继           | (171) |
| 毛细管反相电色谱分离行为的研究..... 魏 伟 王义明 罗国安        | (173) |
| 常用中药——菟丝子中黄酮甙的毛细管电泳分析                   |       |
| ..... 王如骥 罗国安 郭洪祝 李家实                   | (174) |
| 氧氟沙星对映体的毛细管电泳手性分离..... 俞 琦 王义明 罗国安      | (175) |
| 高效毛细管电泳测定银杏叶提取物中的芦丁和槲皮素                 |       |
| ..... 任一平 黄百芬 陈青俊 朱加虹                   | (177) |
| 应用高效毛细管电泳仪快速测定水溶性维生素                    |       |
| ..... 黄百芬 陈青俊 胡青霞 任一平                   | (179) |
| 应用高效毛细管电泳法快速测定碱金属及碱土金属离子                |       |
| ..... 任一平 陈青俊 黄百芬 尚君明                   | (182) |
| 薄层色谱及其他                                 |       |
| 高效薄层色谱在免疫化学分析中的应用..... 徐桂芸 常理文          | (185) |
| 薄层色谱-荧光法测定苦参碱的研究..... 庞志功 汪宝琪 王 翔       | (186) |
| 二维薄层扫描法测定安宫牛黄丸中小檗碱的含量                   |       |
| ..... 邸 欣 赵建华 孙毓庆 吴 文                   | (188) |
| 高速逆流色谱在分离紫杉醇类似物方面的应用..... 曹学丽 邓锦辉 张天佑   | (190) |
| 高速逆流色谱分离苦参中的总生物碱                        |       |
| ..... 袁黎明 张天佑 傅若农 李西宁 邓锦辉 湛学先           | (192) |
| 用 SFE 从脂肪基体中分离有机锡化合物 ..... 丁明玉 罗国安 陈培榕  | (193) |
| 黄酮类化合物超临界流体色谱的分离研究..... 刘志敏 赵锁奇 王仁安 杨光华 | (195) |
| 高速逆流色谱制备分离纯化硫霉素 64 <sup>#</sup> 克隆株发酵产物 |       |
| ..... 杨福全 张天佑 魏贤英 李戎铎 王以光               | (196) |
| 聚白蛋白导向 $\alpha$ -干扰素(pHSA-IFN)制备及其初步应用  |       |
| ..... 刘明旭 张新全 魏振满 蔡光明                   | (198) |
| 高速逆流色谱制备分离银杏黄酮甙元标准品..... 杨福全 张天佑        | (200) |
| 烧结微颗粒大孔吸附树脂萃取柱在药物分析中的应用..... 徐秉玖 左 君    | (201) |
| 一个萃取分离的新方法..... 刘俊亭 范垂昌 卢基贵             | (203) |
| 新型样品制备技术——固相微萃取..... 陈友存 熊少祥 刘国詮        | (204) |
| 膜提取-吸附/热解吸技术在天然食品分析中应用探讨..... 王 立 王继宗   | (206) |
| 火焰原子吸收光谱法测定乌鸡白凤丸中微量重金属铜、铬、镉的含量          |       |
| ..... 田立杰 杨国红 田南开                       | (207) |

## 编后记

## 广告

TSP 公司

PHARMACIA 公司

PE 公司

# 液相色谱-质谱联用在医药方面的应用

蒋 可

(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

色谱是快速灵敏分离有机物的有效手段, 各种检测器中, 除了应用最广泛的 FID(GC) 和 UV(LC) 外, 质谱(MS) 尽管价格较昂贵, 但是其选择性、灵敏度、分子量及结构信息等优势已被公认为高级的通用型检测器, 尤其在复杂基质超痕量分析时, 因其抗化学干扰性和同位素内标的应用而获得的定性定量结果极其可靠, 在公安、违禁药和毒品以及环境剧毒物等重要测试中, MS 数据经常是法定的。

GC-MS 在我国已有 20 年的应用历史。随着台式小型仪器的迅速增长, 在色谱研究中已经成为重要的手段。HPLC 可以直接分离难挥发、大分子、强极性、热稳定性差的化合物, LC-MS 联机曾长期为分析界所期待。由于 LC 流动相与 MS 传统电离源的高真空难以相容, 大量的样品不得不采取脱机方式 MS 鉴定, 或制成衍生物用 GC-MS 分析。大气压电离质谱(APIMS) 的实现为 LC-MS 的兼容创造了机会, 商品化的小型 LC-MS 作为成熟的常规分析仪器, 90 年代已经在生物医药实验室发挥着重要的作用。

## 1 LC-MS 接口方式<sup>[1]</sup>

1.1 传送带方式 70 年代末采用此方式。传送带方式与 MS 传统的 EI、CI 离子源相联。灵敏度差, 不能用反相柱, 待测样品必须气化后再电离。

1.2 粒子束(Particle beam)和热喷雾接口(Thermospray) 80 年代中期采用此方式。粒子束(PB)是由喷雾形成气溶胶, 脱溶剂后溶质粒子的动能使它进入离子源, 气化后在 EI 或 CI 离子源中电离而获得传统的 EI 和 CI 质谱。热喷雾(TSP)时 LC 流出液经过高温加热而超高速喷雾, 产生的离子进入 MS, 中性分子由真空泵抽走。TSPMS 只能获得与分子量有关的信息。

1.3 电喷雾接口(Electrospray) 80 年代后期出现的此方式具有极高的电离效率, 也是最“软”的电离方式之一。金属毛细管将 1~20 $\mu$ l/min 的 LC 流出液通入 API MS, 2~4kV 强电场使雾状液滴表面带电, 辅助氮气流加速溶剂蒸发, 带电离子通过聚焦系统进入 MS 分析室。分析灵敏度达到 fmol(肽), 最适合极性的生物大分子(分子量 > 100kDa), 分子量测定精度达 0.01%。

1.4 大气压化学电离(APCI) LC 流出液喷雾时, 3~6kV 电压的尖针在雾中电晕放电, 它先使溶剂分子形成离子, 在化学电离过程中, 带电的溶剂离子促使待测样品分子电离, 样品离子进入 MS 分析室测定。LC 流动相大多适用于 APCI 接口, 气动雾化容许 1~2ml/min 液体进入, 电离效率高。MS 谱中除了分子离子外, 也存在部分碎片离子。适合于分子量略小和极性较小的化合物。

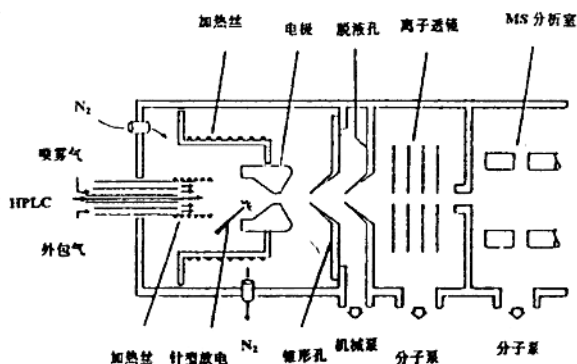


图 1 大气压化学电离(APCI)离子源示意图

## 2 APIMS 信息

(1) 分子离子是最有用的特征离子, 各种 API 方式都可以获得与分子离子有关的信息而算出化合物的分子量。ESI 测定生物大分子时一般直接从流体样品在大气压中得到多电荷离子, 例如分子量为 66420Da 的牛白蛋白 (bovine albumin) 在 ESIMS  $m/z$  1000~2000 的谱中呈现一系列多电荷离子, 如  $[\text{MH}_{49}]^{49+}$   $m/z$  1356.4、 $[\text{MH}_{48}]^{48+}$   $m/z$  1384.6、 $[\text{MH}_{47}]^{47+}$   $m/z$  1414.0... (图 2)。通过计算得到实测分子量为 66412, 与理论值的误差为 0.012%, 利用 MaxEnt 软件可进一步缩小测定误差。

(2) 碎片离子质谱。APIMS 都是软电离, 除了 APCI 有时出现碎片离子外, 一般缺乏与化合物分子结构有关的碎片离子信息。在未知物鉴定或某些特殊分析时可以采用串联质谱与 LC 相联的方式 (HPLC-MS-CID-MS) 以碰撞诱导分解 (CID) 获得分子离子的碎片谱。ESI 时也可以利用离子迁移区锥形小孔 (cone) 处的高电位加速带电离子, 使它在 133.3Pa 压力的离子源中发生多次碰撞而增加内能, 导致分子中某些键断裂形成碎片离子, 在单级小质谱上获得具有结构特征的碎片离子谱, 称它为 LC-CID-APIMS, 亦可用于未知物测定。但是当 LC 分离不好、几个化合物同时流入 MS 时, 混合物的 CID 谱很难解释。CIDMS 谱受仪器参数影响很大, 不存在标准谱图, 目前不存在 LC-APIMS 的谱图库。

(3) 如同 GC-MS 一样, 总离子流 (TIC) 可以与 UV 图相对照, 基峰离子流 (BPI) 有时将更清晰地反映分离状况。特征离子的质量色谱在复杂混合物分析及痕量分析时是 LC-MS 测定中最有用的谱图, 它既有保留值信息, 又具备化合物结构的特征, 抗化学干扰性能好, 常用于定性定量。选择一些特征离子监测的采集记录模式 (SIR) 将得到最佳灵敏度。

(4) 根据化合物性质可选用正或负离子检测方法。

## 3 LC-MS 对 LC 的要求

(1) ESI 的最佳流速是 1~20  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 应用 4.6mm 内径 LC 柱时要求柱后分流比  $< 1/50$ 。目前大多采用 1~2mm 内径的微柱, 并配置 0.1~100  $\mu\text{l}/\text{min}$  的微量泵。采用毛细管 LC 柱时, 柱后必须补充一定的流量。

(2) APCI 的最佳流速 ~1ml/min, 常规的 4.6mm (内径) 柱最合适。

(3) LC-MS 接口避免进入不挥发的缓冲液, 避免含磷和氯的缓冲液, 含钠和钾的成分必须  $< 1\text{mmol/L}$ , 含甲

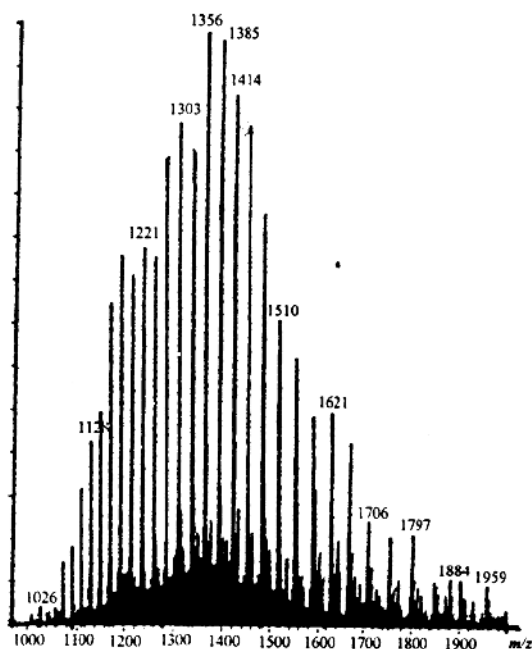


图 2 牛白蛋白 (bovine albumin,  $M_w$  66420Da) 的电喷雾质谱图 (ESIMS)

扫描范围  $m/z$  1000~2000, 实测分子量为 66412, 谱图中显示的多电荷离子 (如 49<sup>+</sup>、48<sup>+</sup>、47<sup>+</sup> 离子) 分别为  $m/z$  1356.4、1384.6、1414.0

酸(或乙酸)<2%,含三氟乙酸<0.5%,含三乙胺≤1%,含醋酸铵<10~5mmol/L。

(4)质量色谱图可用于定性定量,为了提高分析效率,常采用<100mm的短柱(此时UV图上并不能获得完全分离)。

#### 4 HPLC-APIMS在医药中应用举例

(1)在医学应用中的典型例子是血红蛋白(Hamoglobin, Hb)检测<sup>[2]</sup>。成人血红蛋白(HbA)由2条 $\alpha$ -和2条 $\beta$ -珠蛋白(globin)链所组成(分子量为15~16kDa)。当生物体内出现突变或防御流行性疾病时会产生异常的Hb,多于600种异型Hb已被鉴定命名,全世界有1亿5千万人携带异常Hb,仅少部分出现病症,急性红细胞改变或异型Hb增多会导致血红蛋白病及早产儿死亡。医学界近来开始重视异常Hb问题,美国有40个州强制普查新生儿与Hb有关的疾病,以作出早期诊断。Hb的重要改变常能反映体内发生的突变。

常规临床检验多用电泳方法,最新的研究表明,HPLC-ESIMS可以区分1Da差异的变型Hb,弥补了电泳方法的不足,已成功地应用于未知Hb变型体的研究,近100种变型Hb用MS作了测定,至少有12种是由MS技术首先分析出来的。图3是Hasharon型Hb酶解产物的HPLC-ESIMS鉴定

时,用 $m/z$ (619+928)快速地找到了异型肽片段的位置。

魁北克-Chori型Hb的发现更说明了LC-MS在研究方面的特殊意义。镰状细胞性贫血患者有Hb突变,这些异常的红细胞易堵塞毛细血管导致器官损伤、病变及早期突变。有一患者已显露病症,但是等电聚焦检查结果无法解释病因。用ESIMS方法发现了 $\alpha$ -

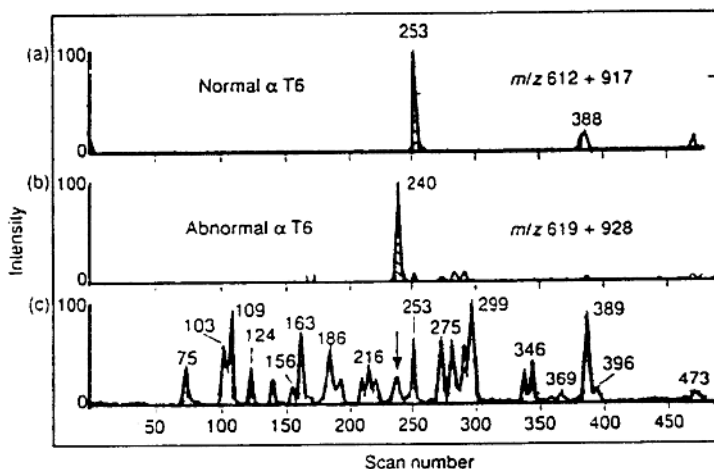


图3 Hasharon型血红蛋白(Hamoglobin)酶解产物的HPLC-ESIMS

(a)正常的 $\alpha$ T6肽段;(b)变型的 $\alpha$ T6;

(c)在基峰离子色谱中箭头处表征此患者血清中含有变型的Hasharon型Hb

-globin (15126Da)、 $\beta$ -globin (11837Da)、异型 $\beta$ -globin (15879Da)及正常的 $\beta$ -globin (15867Da),显然她是从有病的母亲那儿遗传了异型 $\beta$ -globin,从父亲那儿遗传了 $\beta$ -globin,由于 $\alpha$ -globin和异型 $\beta$ -globin的联结造成了电泳试验中HbA位置的假阴性。酶的产物HPLC-ESIMS显示出 $\beta$ T10肽段多了12Da,并证实序列87处的氨基酸(Thr)被(ILE)取代了,这个新Hb被命名为Hb Quebec-Chori。

M. Pedrocchi<sup>[3]</sup>将人心脏中的S-100蛋白质提取出来后和 $\text{CaCl}_2$ 混合,亲和色谱柱处理后用RPHPLC-ESIMS鉴定出3个蛋白质——S100 $\alpha$ 、CACY和CAPL,它们都呈现为单体或同种双倍体,未发现混杂的双倍体。心肌病人可以用S-100蛋白质研究病症与贲门病理之间的关系。

(2)LC-MS 研究药物在生物体内分布、变迁及残留时具有快速、灵敏及前处理可以简化的特点。

肾素抑制剂 CP-80794 是经修饰的肽类药物, H.G. Fouda<sup>[4]</sup> 在每毫升血清中加入 50ng CP 88587 内标, HPLC-APCIMS 测定时用特征离子  $[M-H]^-$   $m/z$  619、633 (内标) 监测定量, 方法检测限为 50ng/ml, 定量线性范围为 0.05~10ng/ml, 分析了 4000 例样品, 研究临床效果。

Wang-Iverson<sup>[5]</sup> 用 HPLC-ESIMS 测人血清中的还原酶抑制剂——含磷酸的 SQ33600, 检测限 2ng/ml, 定量线性范围 2~400ng/ml。

T.N. Robson<sup>[6]</sup> 定量分析生物体液中的 PAF 拮抗剂和一种金属蛋白抑制剂, 他比较了两种方法的灵敏度, HPLC-APCI 时为 pg/ml 级, HPLC-ESIMS 时为 ng/ml。

克喘素 (Clenbuterol) 是一种强力  $\beta$ -肾上腺素功能药物, 应用于气喘病及动物肺病。它和其他  $\beta$ -兴奋剂也用于牧业中的瘦肉剂, 也是运动员违禁药, 使用剂量为  $\mu\text{g/kg}$  级, 肉、血清和尿中的残留量极低。Dorge 用 HPLC-APCIMS 比 TSPMS 方法灵敏度提高了 50 倍。他认为, 采用适当的样品前处理措施后, 将能监测到人血浆中  $\leq 0.08 \times 10^{-9}$  的克喘素<sup>[7]</sup>。

(3)LC-MS 已广泛地用于药物代谢的研究, 包括未知代谢物的结构测定、代谢物在体内的分布及定量。

A.G. Borel<sup>[8]</sup> 用 HPLC-APCIMS 研究抗肿瘤药 CCNU (CAS[13010-47-4]) 在大鼠和人体中的代谢物, 在尿样中测出了 4 种氨基甲酰基代谢物, 为消除 CCNU 造成的异氰酸盐指出了解毒方法。

T.V. Olah<sup>[9]</sup> 研究 5 $\alpha$ -还原酶抑制剂 MK-434 在体内代谢时应用了 HPLC-APCI 方法, 他认为此方法具有灵敏、准确的优点, 1ml 血浆用 C18 微柱前处理, 灵敏度为 0.5~50ng/ml, 流出时间小于 5min, 应用内标物 L-654066 ( $m/z$  358) 测药物母体 ( $m/z$  378) 和代谢物 ( $m/z$  380)。

呱嗪啉醇 (HPL) 及其四氢吡啶脱水产物 (HPTP) 在大鼠体内会生成几种吡啶类镍类 ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+$ ) 代谢物。C.J. Schyf<sup>[10]</sup> 取其尿, 经 SPE 纯化后用 HPLC-ESIMS 和 MS-MS 方法进行分析。他也在脑组织中发现了这些代谢物, 用 HPL 检查治疗的病人, 认为其神经系统可能受到伤害。

D.K. Patel<sup>[11]</sup> 研究了 DNA 介入剂 502U83 (CAS[129026-48-8]) 在大鼠体内的药代动力学及代谢物, 尿和粪经提取后用 SPE 纯化, GC-MS、LC-MS、FABMS 和 NMR 进行测定, 经过生物体内的转换后, 主要代谢物是羟乙基及多个羟甲基团的氧化产物, 鉴定了 3 个主要代谢物, 原药仍是主要组分, 在萘环上没有发现代谢。

(4) 药物品质鉴定。检查同属的头孢氨苄和氯头孢菌素类抗菌素中不纯物时, B.A. Olsen<sup>[12]</sup> 用 HPLC-APCI 鉴定出其中的杂质、生产过程中的副产物、降解产物及药物赋型剂。

X.Z. Qin<sup>[13]</sup> 研究了商品药物包装后的变化。H<sub>2</sub> 受体拮抗剂、Famotidine (FIM)、MW337 的片剂具有薄膜覆盖, 并装在金属膜口袋中, 在 40℃、75% 湿度环境下放置 4 个月后, 用 HPLC-APCIMS 发现了  $\text{MH}^+$   $m/z$  350 的降解产物, MS-MS 结果认为这是在 FIM 的 N-氨基磺基端多了一个碳原子。

## 5 结论

APIMS 是当前 LC-MS 联用技术中最成功的配置<sup>[1,14]</sup>, 并进入了常规应用领域。小型

(下转第 9 页)

# 膜色谱——生物医药制品纯化分离的有效工具

商振华 郭 为 于亿年 周良模

(中国科学院大连化学物理研究所,大连,116012)

膜色谱(Membrane Chromatography, MC)出现于 80 年代末、90 年代初。与柱色谱相比,由于它具有分离能力强、样品容量大、操作压力低、分析速度快、仪器设备成本低、纯化倍数高、所得产物不会造成结构和活性的变化和破坏,易于实现自动化、规模化操作等优点,因此近些年发展十分迅速,已成为液相色谱领域中的一个重要分支,是仅次于化学键合相色谱、离子交换色谱、空间排阻色谱之后,在生物医药领域获得广泛应用的一种色谱分离新技术。特别是其中的生物亲和膜色谱(Bioaffinity Membrane Chromatography, BAMC),它对目标产品具有生物特异性和高度选择性,分离条件温和又不会造成对这些生物样品活性的损失和破坏,这是任何其他色谱技术所无法比拟的,因此越来越受到化学家、生物学家、医学家和药学家的重视和兴趣,正逐步成为生命科学、生物工程、医药卫生领域纯化分离的重要手段。该方面的研究报告每年都在快速增长,许多公司已有商品化的产品出售。

从广义来讲,膜色谱应该包括吸附、化学键合、离子交换、空间排斥、亲和、憎水相互作用等多种分离模式。但从目前的发展趋势来看,真正已经获得实际应用并已商品化、从市场可以买到产品的主要是离子交换和亲和两种分离模式。Millipore、Dow Chem.、Sepracor.、Memtek. Fluka、Knauer、Biochemica 等外国公司已相继推出了它们多种型号、规格和品牌的离子交换膜和亲和膜及其相应的分离器,许多都已申请了专利。在国内大连化学物理研究所也已有包括超滤和微孔过滤在内的多种形式亲和膜及相应的分离器可提供给用户使用,并已申请了中国专利。此外由阴、阳离子交换膜组装的各种径向分离柱也已有商品供应。

两方面的原因促成了膜色谱能在如此短的时间内获得快速的发展。首先是自 80 年代以来膜分离技术无论是在膜材料的合成、选择和改性;制膜技术和设备的改进和发展;膜分离器的设计、加工和制作等方面都有了突飞猛进的进展,这样就能为膜色谱提供性能优良的基质材料。另一方面,在此期间亲和色谱在介质的活化方法、间隔臂的共价结合、配基的选择和偶联、亲和分离和洗脱、再生方法及条件的选择和优化等方面也都有了很大的发展。膜分离技术和亲和色谱两者的有机结合,便产生了一种全新的生物大分子纯化分离行之有效的技术——生物亲和膜色谱。

自 90 年代以来,膜的化学改性已成为膜技术领域里一个十分活跃的领域,并带来了十分可观的经济效益。正如 S. E. Zale 博士所指出的:“膜的表面改性技术领导膜进入了 90 年代”;“未来的 10 年将是产生新的更为先进的第三、第四代膜的时代”;“到 2000 年在种类繁多的膜的改性技术中,带活性配基的亲和分离膜将起主导作用”。表 1 列出了八九十年代美国膜市场的生产和销售发展情况及对 2000 年膜市场的预测,可反映出膜色谱在美国的发展趋势和走向。

作者曾经对膜亲和色谱作过较为系统的介绍和评述,本文由于篇幅所限不能对它们作详细的介绍,只能就其中有代表性的几种膜、分离器及应用情况作一概略描述。

与柱色谱相比,膜色谱的最大优势在于它的渗透性好,死体积小,质量传递路径短、速率快。以用平均孔径为  $0.45\mu\text{m}$  微孔滤膜制成的直径为  $47\text{mm}$ 、体积为  $15\text{ml}$  的碟式膜分离器为例,它比用同样平均孔径硅胶填料制成的同样体积的通常分析色谱柱的死体积要小十多倍,质量传递速率前者要比后者大数百倍,因此它们无论在分离速度还是效能上都要差数十到数百倍。

表 1 美国膜市场的生产和销售概况

(单位:万美元)

| 年 代           | 1980                                                      | 1990  | 2000                                               |
|---------------|-----------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------|
| 产值            | 4500                                                      | 27800 | 156500                                             |
| 增长倍数          | 1                                                         | 6.2   | 5.6                                                |
| 化学改性膜所占比例 / % | 5                                                         | 23    | 44                                                 |
| 各种化学改性膜产值     | <div> <div>亲膜</div> <div>离子交换膜</div> <div>其他</div> </div> |       | <div>30000</div> <div>25000</div> <div>15000</div> |
| 用于亲和分离的试剂     | 200                                                       | 700   | 8000                                               |

(1)离子交换膜 离子交换膜是较早年在色谱分离中被使用的一种膜介质。Millipore 公司最早推出含有二乙基氨乙基(DEAE)弱阴离子和羧甲基(CM)弱阳离子交换基团的膜,它们的分离器商品名为 MemSep,体积分别为  $1.4\text{ml}$  和  $4.9\text{ml}$ 。对样品的结合容量分别为  $15\text{mg}$  和  $60\text{mg}$ 。已成功地用于铁传递蛋白、卵清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白-A 等的纯化分离。作者所在研究所和军事医学科学院合作,以聚乙烯和纤维素为骨架进行共聚合,然后在共聚物上键合了含三乙胺基(QAE)、二乙基氨乙基(DEAE)、磺丙基(SP)和羧甲基(CM)等类阴、阳离子交换膜,制成了圆筒式径向离子交换柱,样品由圆柱的周围向中心流动,对人血浆组分、单克隆抗体、白细胞介素-2 等生物制剂进行了纯化分离。现在已有商品名为 Sino Chrom、直径为  $57\text{mm}$ 、 $67\text{mm}$  不同规格的产品。

(2)化学改性聚砜膜 聚砜是一种具有优良膜性能的材料,最早被制成板式、卷式、中空纤维等多种形状的反渗透(RO)和超滤(UF)膜分离器。在气体分离、海水淡化、超纯水的制取、生物医药制剂中细菌和微生物的去除等领域被广泛使用。然而由于其分子结构本身没有可直接用来进行反应的活泼基团,因此限制了它在膜色谱中的应用。Nguyen 和 Male 等人采用亲和超滤技术,先把生物配基(如胰蛋白酶等)共价结合在含活泼官能团的聚合物上,再让其通过具有一定孔径大小的聚砜超滤膜,以去除其他杂质。然后在适当条件下把收集起来的胰蛋白酶从聚合物介质上解离下来,获得纯胰蛋白酶,回收率可达  $80\%$  以上。采用这种亲和超滤技术还分离了免疫球蛋白、碱性磷酸酯酶等。Powers 等人则将氨基苯甲醚共价结合到一个脂质体上再用亲和超滤法从牛胰抽提物中对胰蛋白酶和糜蛋白酶进行了分离提取,回收率可达  $68\%$ ,所得酶的纯度可高达  $98\%$ 。作者采用酰化-氨化和氯甲基化-胺化两种途径分别对国产和进口两种聚砜材料进行化学改性,转化率分别达到  $40\%$  和  $70\%$  左右。采用相转化法制成了平均孔径为  $45\text{nm}$ 、孔径分布比较均匀的具有类指状孔结构的化学改性聚砜超滤膜。在这种膜上共价结合上一定长度的空间臂后,使其与胰蛋白酶共价结合,制成了可用来直接纯化分离其抑制剂的亲和超滤膜。膜上固载化胰蛋白酶的比活分别达到  $1.2 \times 10^4 \text{U/g}$  和  $2.1 \times 10^5 \text{U/g}$ ,已成功地应用于大豆胰蛋白酶抑制剂的纯化分离,所得产物的纯度在  $98\%$  以上。Ansorge 和 Staude 等人也曾对聚砜进行了化学改性,并在其上固载化了尿素酶和葡聚糖酶,分别用于脲的水解和葡聚糖的降解反应动力学研究。

(3)纤维素膜 这是目前在膜色谱中用得早广泛的一种。但通常使用的市售微孔纤维素膜孔径分布不均匀,大量细短纤维素的存在很容易使细孔被异物阻塞,其机械强度和化学稳定性都较差,因此都要事先进行化学处理和交联。Gasteshead 等人在再生纤维素膜上键合上 F3G 活性染料,配基密度可达  $15\mu\text{mol/ml}$ ,用它装入直径为  $25\text{mm}$  的碟式膜分离器中,可以结合  $70\text{mg}$  人血清白蛋白,只需  $1\text{mm}$  厚的膜即可达 1500 理论板数。制成外径为  $1\text{cm}$ 、长度为

10cm 圆筒式的卷式膜分离器,缠上 40 圈膜后,其上的 F3G 配基可与 20mg 的人血清白蛋白结合。作者采用碱和环氧试剂对纤维素膜进行预处理和交联后,不仅提高了它的通透量,改善了其机械和化学稳定性,还使它与活性染料配基 K2BP 和 F3GA 的键合能力提高了 5 倍左右,所制成的碟式微孔亲和膜分离器已经在  $\alpha$ -干扰素、白蛋白和碱性磷酸酯酶等生物大分子的纯化分离中获得了良好的结果。在其上键合带组氨酸配基的亲和膜,已成功地用于生物制剂中内毒素的去除。

(4) 聚酰胺膜 聚酰胺类微孔滤膜是仅次于纤维素膜在膜色谱中得到广泛应用的另一种基质材料。Degen 等人采用三氯三嗪(T-S-T)和  $N,N'$ -二环己基碳二亚胺(DCC)活化了多种聚酰胺类微孔滤膜,制成了孔径为  $0.1\sim 0.45\mu\text{m}$ 、比表面积为  $8\sim 24\text{m}^2/\text{g}$  的、含有单克隆抗体、多克隆抗体、外源凝集素、糖蛋白等多种配基的微孔亲和膜。以折叠方式嵌入一个外径为 6.35cm、长度为 25.4cm 的圆筒内,采用类似于径向流动的方式用作相应抗原、糖蛋白、A 蛋白、凝固因子等的纯化分离,获得了良好的效果。M. Unarska 等人也在孔径为  $0.45\mu\text{m}$  和  $3.0\mu\text{m}$  的尼龙膜上成功地固载化上免疫球蛋白,研究了它和 A 蛋白之间的亲和动力学过程。作者使用孔径为  $0.45\mu\text{m}$  的尼龙 66 膜,先用酸对其进行水解,再用戊二醛、环氧、咪唑等方法对其进行活化,并共价结合上含不同碳原子数的空间臂和组氨酸、粘多菌素 B 等亲和配基,所制成的这种亲和膜分离器能成功地去除医用注射水、人血清白蛋白、氨基酸注射液、溶菌酶等多种制剂中的内毒素,去除率一般都在 90% 以上。

(5) 其他高聚物膜 近些年又出现了一些新的高分子材料(如羟乙基甲基丙烯酸酯、三羟甲基丙酮酰胺、缩甘油甲基丙烯酸酯等的聚合物),它们的分子结构上带有可直接用来进行活化和反应的羟基,可方便地与含氨基、巯基、羧基等间隔臂分子和配位基分子反应,制成多种类型的离子交换或亲和介质,已在单克隆抗体、干扰素、免疫球蛋白、表皮生长因子和多种酶等生物制品的纯化分离中获得了应用。D. Josic 等人即以聚缩甘油甲基丙烯酸酯膜为基质材料,制成了带二乙基氨基、羧甲基等阴、阳离子交换微孔滤膜和带肝素、胶原蛋白为配基的亲和膜,设计制作了带有 20 多种不同形状样品分流板,直径分别为 10、25、50mm 的碟式膜分离器,分别对血浆、血清样品作了分离。结果表明,它们能对肌红蛋白、伴清蛋白、胰蛋白酶抑制剂、铁蛋白、卵清蛋白等生物大分子进行有效的分离。Iwata 等人采用辐射诱导接枝聚合技术(Radiation-induced graft Polymerization)将缩甘油甲基丙烯酸酯聚合到聚乙烯中空纤维微孔膜上,然后用环氧法使其转化为亚氨基二醋酸基,再使其与二价铜离子相整合,制成了带有金属亲和配基的中空纤维 M,通透量可达  $1.9\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ ,膜上配基浓度可达  $2\text{mmol/g}$ ,使其成为具有良好亲水性的膜,大大减少了非特异性吸附。

生物大分子的亲和膜分离是一个非常复杂的过程,目前对其分离结果的处理绝大部分仍是经验式的,真正基于物理-化学-生物特异性相互作用的关系式还没有。最早提出的亲和模型是基于配基-蛋白之间的吸附-解离平衡过程。最近 Suen 用对流、扩散和 Langmuir 吸附理论对亲和膜分离过程进行了数学表达和分析,推导出了蛋白质和配基之间形成的络合物浓度与蛋白浓度、配基浓度之间的关系式。无论是吸附-扩散理论,还是吸附-对流-扩散理论,其最大的不足在于没有考虑生物大分子在构型和性质上的生物特异性相互作用,而大量事实证明这种作用不仅普遍存在,而且在许多情况下起着决定性的作用。正因为如此,最近已经有人利用这种生物特异性相互作用开展了对生物大分子结构的分子识别技术研究,并建立和开拓了一系列有关该技术的软件,正引起人们普遍的兴趣和关注。相信在此基础上,有可能发展出更为完善的亲和膜色谱理论,促进色谱技术更快的发展。

# 细胞膜受体色谱法 ——研究药物与受体作用的新方法

贺浪冲

(西安医科大学药学院, 西安, 710061)

耿信笃

(西北大学现代化学分离研究所, 西安, 710069)

根据仿生化学原理, 结合色谱分离技术, 本文提出一种新的色谱方法, 称作细胞膜受体色谱法(Cell Membrane Receptor Chromatography, CMRC), 定义为: 以含受体的细胞膜为固定相, 利用溶质分子与相应受体大分子间特异性分子间作用力的不同进行分离测定的液相色谱方法。

## 1 CMRC 法模型的建立

分子细胞生物学的研究表明, 受体大分子主要镶嵌在细胞膜上, 属于整合膜蛋白(Integral Membrane Protein), 其量极微, 要得到毫克数量级的纯品非常困难, 所以难以制备纯受体固定相。而通过细胞膜制备技术得到含受体细胞膜的 CMRC 法, 不仅可以克服上述困难, 而且最大限度地保持受体分子的立体结构和生物活性, 使该色谱系统更接近体内过程。

为建立 CMRC 的色谱模型, 根据受体和药物分子的特性, 特作如下基本假设:

(1) 药物分子与受体大分子间存在着包括氢键力、疏水作用力和范德华力在内的特异性亲和力。

(2) 膜受体大分子表面存在着多个可与药物分子作用的活性点, 活性点数( $n$ )和位置随药物分子性质的不同而不同, 对同类药物则有相近和一定数量的活性点。

(3) 膜受体上的 1 个活性点(A)与 1 个药物可逆结合, 同时这种结合具有立体特异性和饱和性。同时 1 个活性点(A)也与 1 分子强溶剂可逆结合。

(4) 膜受体活性点表面溶剂化, 强溶剂(S)有置换药物分子的能力, 和药物分子性质相近的竞争性药物也具备置换能力。但是同类药物的相互置换能力不同。

(5) 由于同类药物分子性质、结构的差异, 在同一受体上其作用位点和强度也存在差异性。

(6) 药物在受体上的作用位点和强度决定着受体的存在状态, 受体在特定状态下才产生生物效应。

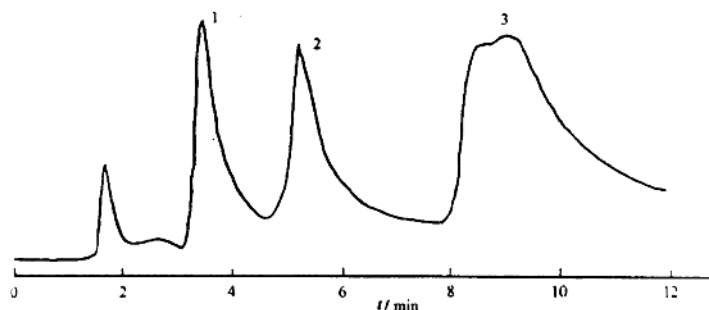


图1 阿托品类药物色谱图

1—东莨菪碱; 2—山莨菪碱; 3—阿托品

色谱条件: 色谱柱 MR-SP 柱(150mm×1.5mm, 7 $\mu$ m)

流动相 0.05mmol/L 磷酸缓冲液(pH=3.0)

流速 0.2ml/min, 室温

检测波长 220nm

## 2 应用实例

根据 CMRC 法原理,用大鼠脑组织 M 胆碱受体为固定相,对阿托品、山莨菪碱和东莨菪碱的保留行为进行了初步测定(图 1),不同药物与固定相作用强度不同,相对于阿托品、东莨菪碱和山莨菪碱的作用强度要弱。

用含钙通道受体的大鼠脑突触体膜为固定相,对二氢吡啶类钙拮抗剂硝苯地平、尼卡地平、尼群地平和尼莫地平的保留行为进行了初步测定(图 2),各药物与固定相的作用强度也不相同,在给出色谱条件下,相对作用强度的次序为:尼群地平>尼莫地平>尼卡地平>硝苯地平。

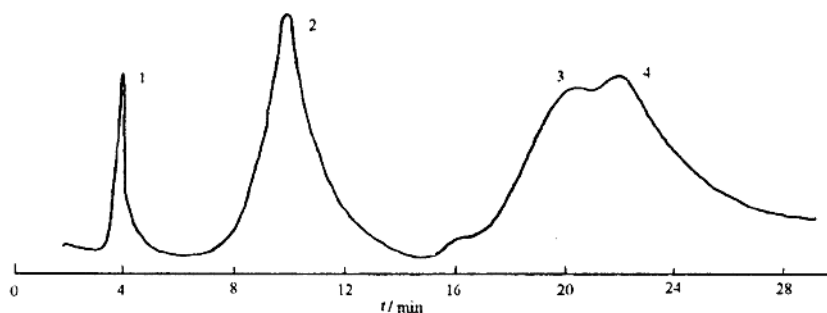


图 2 二氢吡啶类药物色谱图

1—硝苯地平;2—尼卡地平;3—尼莫地平;4—尼群地平

谱条件:色谱柱 CR-SP 柱(150mm×1.5mm,7μm)

流动相 0.05mmol/L 磷酸缓冲液(pH=7.4)

流速 0.2ml/min,室温

检测波长 220nm

(上接第 4 页)

LC-MS 仪器所达到的灵敏度和高效率以及分子量等结构数据和内标法可靠定量等优点是很难为另一种仪器所同时拥有的,其性能/价格比的优势使它成了新药研究中必不可少的手段。

作者实验室引进的 VG PLATFORM 运转一年来已经开展了糖蛋白和农药残留方面的研究,并对外承接样品分析和科研合作,为提高我国生物医药分析水平而共同努力。

## 6 参考文献

- 1 Voyksner R D. Environ Sci Technol, 1994, 28(3): 118A
- 2 Shackleton C H L, et al. Anal Chem, 1996, 29A
- 3 Pedrocchi M, et al. Biochem Biophys Commun, 1993, 197(2): 529
- 4 Fouda H G, et al. J Am Soc Mass Spectrom, 1991, 2(2): 164
- 5 Wang - Iverson D, et al. Biol Mass Spectrom, 1992, 21(4): 189
- 6 Robson T N, et al. Anal Proc, 1994, 31(5): 159
- 7 Doerge D R, et al. Fisons Application Note, No. 208
- 8 Borel A G, et al. Drug Metab Dispos, 1993, 21(5): 889
- 9 Olah T V, et al. J Pharm Biomed Anal, 1994, 12(5): 705
- 10 Schyf C J, et al. Chem Res Toxicol, 1994, 7(3): 281
- 11 Patel D K, et al. Drug Metab Dispos, 1993, 21(1): 62
- 12 Olsen B A, et al. J Chromatogr, 1993, 648(1): 165
- 13 Qin X Z, et al. J Pharm Biomed Anal, 1994, 12(2): 221
- 14 Desiderio D M, Ed. Mass Spectrometry: Clinical and Biomedical Applications. New York: Plenum, 1994